

Unexamined Japanese Patent Publication 2002-131316

(57) Abstract

[Object] An object of the invention is to provide a method of ELISA which determines a wide variety of organochlorine compounds such as PCBs, dioxins and the like, and which can replace the conventional complicated methods of measuring the same.

[Means for solving the problems] Succinimide ester of a formula (1)

[Compound 1]

(wherein R^1 represents chlorine or phenyl, R^2 and R^3 represent hydrogen or chlorine, and m is an integer of 5 to 7) is bound to a carrier protein and solidified to determine the organochlorine compounds using ELISA.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-131316
(P2002-131316A)

(43) 公開日 平成14年5月9日 (2002.5.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	G
33/535		33/535	
33/577		33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-325553 (P2000-325553)

(22) 出願日 平成12年10月25日 (2000.10.25)

(71) 出願人 000237204

富士レピオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72) 発明者 大村 正史

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

富士レピオ株式会社内

(72) 発明者 丹羽 敏博

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

富士レピオ株式会社内

(74) 代理人 100098431

弁理士 山中 郁生 (外3名)

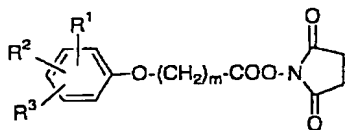
(54) 【発明の名称】 有機塩素化合物の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 従来の煩雑な測定法に替わる P C B やダイオキシンなどの広汎な有機塩素化合物を酵素免疫測定法で測定する方法の提供。

【解決手段】 一般式

【化1】

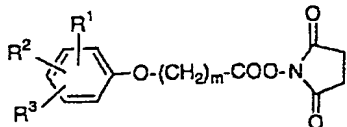


(式中、 R^1 は、塩素原子またはフェニル基、 R^2 および R^3 は、水素原子または塩素原子であり、 m は、5ないし7の整数である。)で表されるサクシニミドエステルをキャリアープロテインに結合させ、固相化し、酵素免疫測定法により有機塩素化合物を測定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

【化1】



で表されるサクシンイミジルエステルを用いる有機塩素化合物の測定方法（式中、 R^1 は、塩素原子またはフェニル基、 R^2 および R^3 は、水素原子または塩素原子であり、 m は、5ないし7の整数である。）。

【請求項2】 m が5である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 R^1 、 R^2 および R^3 が塩素原子である請求項1に記載の方法。

【請求項4】 R^1 がフェニル基であり、 R^2 および R^3 が水素原子である請求項1に記載の方法。

【請求項5】 R^1 、 R^2 および R^3 が塩素原子であり、 m が5である請求項1に記載の方法。

【請求項6】 R^1 がフェニル基、 R^2 および R^3 が水素原子であり、 m が5である請求項1に記載の方法。

【請求項7】 測定方法が酵素免疫測定法であり、請求項1ないし6に記載のいずれかの化合物を用いる有機塩素化合物の測定方法。

【請求項8】 請求項1ないし6のいずれかに記載の化合物をキャリアープロテインに結合させ、固相化し、競合法により行う請求項7に記載の方法。

【請求項9】 モノクローナル抗体を使用する請求項7ないし8に記載の方法。

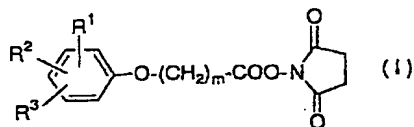
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、一般式

【0002】

【化2】



【0003】（式中、 R^1 は、塩素原子またはフェニル基、 R^2 および R^3 は、水素原子または塩素原子であり、 m は、5ないし7の整数である。）で表されるサクシンイミドエステルを用いる有機塩素化合物の測定方法であり、PCBやダイオキシンなどの有機塩素化合物を酵素免疫測定法で測定する際の試薬として使用できる。

【0004】

【従来の技術】 従来、PCBやダイオキシンは、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、それらのいずれかとマススペクトロメトリーとを一体化した機器等を用いて測定していたが、これらの測定機器は大変高価であり、また、サンプルが土や水の場合は、これら機器測定前に濃縮操作を行わねばならず、煩雑であった。これらの問題は酵素免疫測定法を採用することで解決することができた。この方法は、迅速かつ簡便、低コストで高感度測定ができるが、測定対象の物質が限定的であり、改良が望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、簡便な有機塩素化合物の測定方法を提供することが目的である。さらに、本発明は、広汎な有機塩素化合物の測定方法を提供することが目的である。

【0006】

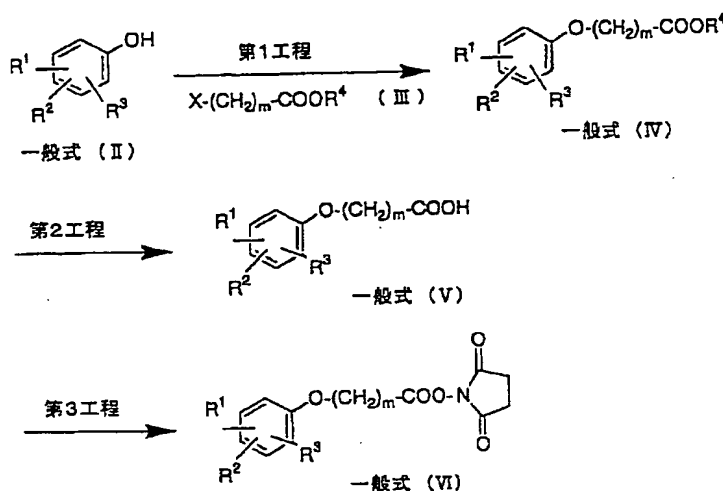
【課題を解決するための手段】 かかる課題を解決するため本発明者らは、新規な前記一般式（I）で表されるサクシンイミドエステルを見出した。本発明の前記一般式（I）で表されるサクシンイミドエステルを用いるとPCBやダイオキシンなどの有機塩素化合物を酵素免疫測定法により広汎に測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

【発明の実施の形態】 本発明の前記一般式（I）で表されるサクシンイミドエステルは以下の式に従い製造することができる。

【0008】

【化3】



【0009】(式中、 R^1 は、塩素原子またはフェニル基、 R^2 および R^3 は、水素原子または塩素原子、 R^4 は、アルキル基またはアリール基であり、 m は、5ないし7の整数である。 X は、ハロゲン原子である。)

(第1工程)本工程は、前記一般式(I)で表されるフェノール誘導体と一般式(III)で表されるハロ脂脂肪酸エステルとを塩基の存在下、反応させることにより前記一般式(IV)であらわされるエステルを製造することができる。

(第2工程)本工程は、第1工程で得られた前期一般式(IV)で表されるエステルを加水分解することにより前記一般式(V)で表されるカルボン酸を製造することができる。

(第3工程)本工程は、第2工程で得られた前期一般式(V)で表されるカルボン酸にN-ヒドロキシサクシイミドを縮合させることにより前記一般式(VI)で表されるサクシイミジルエステルを製造することができる。

【0010】以上の工程を経て、本発明に使用ができる化合物としては、たとえば、トリクロロフェノキシヘキサン酸サクシイミドエステル、トリクロロフェノキシヘプタン酸サクシイミドエステル、トリクロロフェノキシオクタン酸サクシイミドエステル、ジクロロフェノキシヘキサン酸サクシイミドエステル、ジクロロフェノキシヘプタン酸サクシイミドエステル、ジクロロフェノキシオクタン酸サクシイミドエステル、クロロフェノキシヘキサン酸サクシイミドエステル、クロロフェノキシヘプタン酸サクシイミドエステル、クロロフェノキシオクタン酸サクシイミドエステル、フェニルフェノキシヘキサン酸サクシイミドエステル、フェニルフェノキシヘプタン酸サクシイミドエステル、フェニルフェノキシオクタン酸サクシイミドエステルである。

【0011】本発明は、前記一般式(I)で表されるサクシイミドエステルを用い免疫測定方法を利用し、有機塩素化合物を測定するものである。

【0012】免疫測定方法は、測定対象が有機塩素化合物であることから、酵素免疫測定方法を採用することが好ましいが適当な測定系を組めるならば、これに限られるものではない。

【0013】酵素免疫測定法においては、前記一般式(I)で表されるサクシイミドエステルと検体中の有機塩素化合物に酵素標識抗体を競合反応させる方法が、測定対象化合物の分子の形態上好ましい。競合反応は、KLH、BSA等のキャリアープロテインに前記一般式(I)で表されるサクシイミドエステルを結合させ固相化し、検体中の有機塩素化合物との間に酵素標識抗体を反応させることにより行うものである。

【0014】本発明に使用することができる酵素標識抗体の酵素は、測定系により影響のない酵素を使用でき、その点、アルカリフォスファターゼは簡便に使用できる。抗体は、本発明を実施することができる抗体ならばいずれの抗体でもよいが、WO99/43799に記載のモノクローナル抗体は、感度を向上させる上からも好ましい抗体といえる。なお、本発明は、測定系の組み易さから前記一般式(I)で表されるサクシイミドエステルをKLH、BSA等に結合させ固相化する方法を挙げたが、本発明がこの方法に限られるものではない。測定に際しては通常酵素免疫測定の測定環境が整えばよく、特に緩衝溶液等に制限はない。本発明により測定できる有機塩素化合物は、PCB、ダイオキシン等である。

【0015】実施例

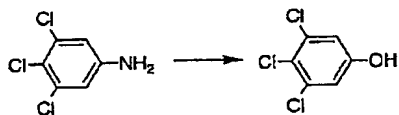
以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により限定されるものではない。

【0016】参考例1

3, 4, 5-トリクロロフェノールの合成

【0017】

【化4】



【0018】0℃で、3, 4, 5-トリクロロアニリン 1.00 g (5.6 mmol) を無水エタノール100 ml に溶解し、42%フルオロホウ素酸 3.16 ml (15.1 mmol)、亜硝酸イソamil 0.92 g (7.8 mmol) を加え、30分攪拌した。次いで、この溶液を300 ml のエーテルに注ぎ、析出した結晶を集めた。得られた結晶に300 ml の水を加え、硝酸銅(II)三水合物100 g、酸化銅(I) 1.29 g を加え室温で18時間攪拌した。反応終了後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=5:1)で精製し、3, 4, 5-トリクロロフェノール 360 mg (収率33.7%)を得た。

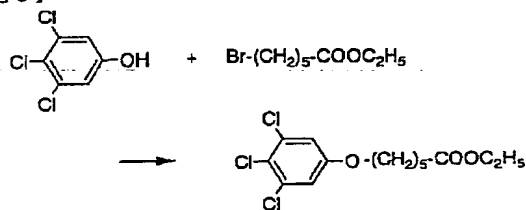
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.22 (bs, 1H), 6.92 (s, 2H) ppm.

参考例 2

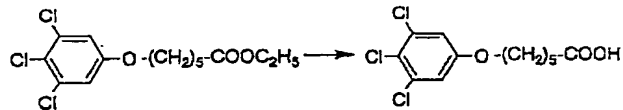
6-(3, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0019】

【化5】



【0020】アルゴン気流下、3, 4, 5-トリクロロフェノール 50 mg (0.253 mmol) の無水ジメ



【0022】6-(3, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル 374 mg を酢酸 3 ml に溶解し、濃塩酸 1 ml を加え、2.5時間加熱還流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。酢酸エチル-ヘキサンから再結晶し標記化合物 162 mg (収率46.8%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.47~1.56 (m, 2H), 1.67~1.76 (m, 2H), 1.76~1.85 (m, 2H), 2.40 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J=6.3$ Hz, 2H), 6.93 (s, 2H) ppm.
mp: 87.0~88.0℃

チルホルムアミド溶液 (5 ml) に60%油性水素化ナトリウム 11.0 mg (0.276 mmol) を加え、室温で15分間攪拌した。続いて6-ブロモヘキサン酸エチル 51 mg (0.23 mmol) を加え、室温で18時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=20:1)で精製し、6-(3, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル 27 mg (収率31.0%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.26 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.44~1.53 (m, 2H), 1.62~1.74 (m, 2H), 1.775~1.84 (m, 2H), 2.33 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 4.13 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 6.93 (s, 2H) ppm.

IR (liquid film): 2944, 1738, 1588, 1440, 1292, 1250, 1144 cm^{-1}

Mass (m/z , %): 342 (M^++4 , 5), 340 (M^++2 , 16), 338 (M^+ , 16), 200 (7), 198 (22), 196 (24), 143 (100), 115 (31), 97 (59), 69 (57).

参考例 3

6-(3, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0021】

【化6】

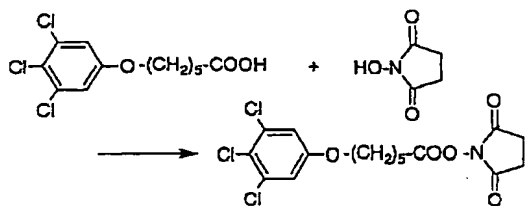
IR (KBr): 3085, 2950, 1712, 1585, 1555, 1440, 1254, 1145 cm^{-1}
Mass (m/z , %): 314 (M^++4 , 10), 312 (M^++2 , 32), 310 (M^+ , 33), 200 (30), 198 (97), 196 (100), 115 (86), 97 (59), 69 (61).

参考例 4

N-スクシンイミジル-6-(3, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0023】

【化7】



【0024】6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸100mg (0.32mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド41mg (0.35mmol)塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド68mg (0.35mmol)を加え、室温で22時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶しN-スクシンイミジル-6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート111mg (収率84.4%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.55~1.63 (m, 2H), 1.78~1.87 (m, 4H), 2.65 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 2.84 (bs, 4H), 3.93 (t, $J=6.2\text{Hz}$, 2H), 6.94 (s, 2H) ppm.
mp: 88.0~89.0°C

IR (KBr): 2947, 1811, 1787, 1749, 1583, 1555, 1213, 1079 cm^{-1}
Mass (m/z , %): 411 (M^++4 , 13), 409 (M^++2 , 39), 407 (M^+ , 40), 297 (9), 285 (27), 293 (27), 200 (9), 198 (27), 196 (28), 97 (100), 69 (90).

参考例4

ウシ血清アルブミン複合体の合成

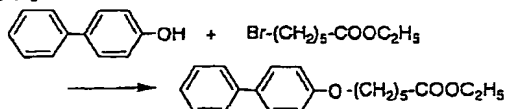
ウシ血清アルブミン5.0mgを0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900 μl に溶解し、N-スクシンイミジル-6-(3,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート1.1mgの無水ジメチルホルムアミド溶液(100 μl)を加え、室温で5時間攪拌した。その後反応液をPBS中で透析し脱塩した。

【0025】参考例5

6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0026】

【化8】



【0027】4-フェニルフェノール851mg (5.

0mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム1380mg (10.0mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチル1171mg (5.25mmol)を加え、室温で3日間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-ヘキサンから再結晶し標記化合物1063mg (収率68.1%)を得た。

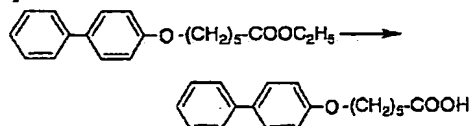
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.26 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.53 (m, 2H), 1.72 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 2.35 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 4.00 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 2H), 4.14 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 6.96 (d with fine coupling, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.30 (t with fine coupling, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 7.42 (t with fine coupling, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 7.51 (d with fine coupling, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.55 (d with fine coupling, $J=8.2\text{Hz}$, 2H) ppm.

参考例6

6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0028】

【化9】



【0029】6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサン酸エチル630mg (2.0mmol)をエタノール40mlに溶解し、4N水酸化リチウム水溶液0.8ml (3.2mmol)を加え室温で22時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧下留去し、1N塩酸水溶液にて酸性とした後、クロロホルム、メタノールの混合溶媒で抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。酢酸エチル-エーテル-ヘキサンから再結晶し標記化合物489mg (収率85.4%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.57 (m, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.84 (m, 2H), 2.42 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 4.01 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 2H), 6.96 (d with fine coupling, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.30 (t with fine coupling, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.41 (t with fine coupling, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.51 (d with fine coupling, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.55 (d with fine coupling,

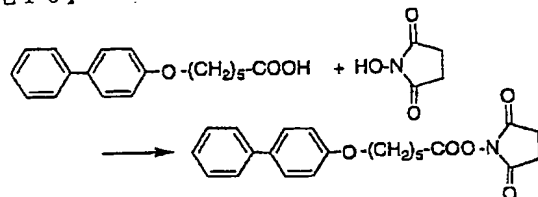
$J = 7.1 \text{ Hz}$, 2 H) ppm.

参考例 7

N-スクシンイミジル-6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0030】

【化10】



【0031】6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサノ酸 489mg (1.72mmol) の無水塩化メチレン溶液 (15ml) にN-ヒドロキシスクシンイミド 218mg (1.89mmol) 塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド 362mg (1.89mmol) を加え、室温で2日間攪拌した。反応終了後、1N塩酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、標記化合物 477mg (収率 72.6%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3); δ 1.63 (m, 2H), 1.86 (m, 4H), 2.67 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H), 2.84 (br, 4H), 4.02 (t, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 2H), 6.96 (d with fine coupling, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H), 7.30 (t with fine coupling, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H), 7.41 (t with fine coupling, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H), 7.51 (d with fine coupling, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 2H), 7.55 (d with fine coupling, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H) ppm.

参考例 8

ウシ血清アルブミン (BSA) 結合ビフェニル (BP-BSA) の合成

BSA 5.0mg を 0.1M のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 900 μl に溶解し、N-スクシンイミジル-6-(4-フェニルフェノキシ)ヘキサノエート 1.0mg の無水ジメチルホルムアミド溶液 (100 μl) を加え、室温で終夜攪拌した。その後反応液を PBS 中で透析し脱塩して、標記 BP-BSA を得た。

【0032】参考例 9

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成
カルボキシル化フェライト粒子 (日本ペイント社製) を

0.1M リン酸緩衝液 pH 5.0 にて3回洗浄し、同緩衝液 1ml にて懸濁後、5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した参考例 8 で作成した BP-BSA 溶液 1ml を添加し 25 $^{\circ}\text{C}$ 2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05M メス緩衝液 pH 5.5 1ml に懸濁し、80 mg/ml の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (ナカライタスク社製) 水溶液を 50 μl 添加して、ローテーターで 25 $^{\circ}\text{C}$ 30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を 2ml 添加しローテーターで 37 $^{\circ}\text{C}$ 一晚回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を 1.5% に合わせて BP-BSA 感作粒子を得た。

【0033】また、前記 BP-BSA の代えてウシ血清アルブミン結合 PCB#77 (PCB#77 (3, 3', 4, 4'-テトラクロロビフェニル)-BSA; KRI 社製) を用いて PCB#77-BSA 感作粒子を得た。

【0034】参考例 10

アルカリフォスファターゼ標識抗 PCB#77 抗体の作成

抗 PCB#77 モノクローナル抗体 (PCB#77 B 抗体; KRI 社製) を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ (ALP; オリエンタル社製) を結合し ALP 標識抗 PCB#77 抗体を得た。

【0035】実施例 1

PCB#77 の測定

PCB#77 の測定は、全自動化学発光免疫測定システム (ルミバルス f; 富士レビオ社製) を用いた 1 ステップ競合法にて行った。参考例 9 で作成した BP-BSA 感作粒子または PCB#77-BSA 感作粒子液各 150 μl に PCB#77 の標準抗原液 90 μl と ALP 標識抗 PCB#77 抗体液 50 μl を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 20分間免疫反応を行い、洗浄後基質 (AMPPD) 液 200 μl を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ 5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0036】前記標準抗原液は、PCB#77 (ジーエルサイエンス社製) を 10% ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液に溶解して作成した。PCB#77 は 0~100 ng/ml の濃度に調整し、標準抗原 0 濃度のカウント値を 100% とした時の各標準抗原液の応答 (B/B0 (%)) で標準曲線を求めた。その結果を図 1 に示す。感作粒子について、PCB#77-BSA 感作粒子と BP-BSA 感作粒子とを比較したところ、BP-BSA 感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表 1 に示す。

【0037】

【表 1】

表-1 PCB誘導体と代替誘導体の比較

	PCB#77測定系		PCB#126測定系		PCB#169測定系	
	BP-BSA*	PCB#77-BSA	TCP-BSA**	PCB#126-BSA	TCP-BSA	PCB#169-BSA
IC15%	1	3	0.2	0.6	0.3	1.0
IC50%	6.3	37.5	2.8	3.1	2.1	3.3

単位は ng/ml

*BP:ビフェニル

**3,4,5-TCP:トリクロロフェノール

【0038】また、BP-BSA感作粒子を用いたPCB#77測定系に対するPCB#126 (3, 3' 4, 4' -ペンタクロロビフェニル) とPCB#169の交叉反応性と比較的毒性の高い (毒性等価係数; TEF 0.1以上) ダイオキシン11種との交叉反応性の測定結果を表2および表3に示す。その結果からPCB#7

7測定系ではPCB#126と16.3%の交叉反応性を示したが、ダイオキシンとの交叉反応性は示さなかった。

【0039】

【表2】

表-2 交叉反応性-1

	PCB#77測定系	PCB#126測定系	PCB#169測定系
PCB#77	-	7.1	6.3
PCB#126	16.3	-	100
PCB#169	-	<1	-

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)。

【0040】

【表3】

表-3 交叉反応性-2

	PCB#77測定系	PCB#126測定系	PCB#169測定系
2,3,7,8-TCDD	-	-	6.9
1,2,3,7,8-PeCDD	-	0.5	37.2
1,2,3,4,7,8-HxCDD	-	19.7	0.2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	-	-	10.2
1,2,3,7,8,9-HxCDD	-	-	0.2
2,3,7,8-TCDF	-	-	4.4
2,3,4,7,8-PeCDF	-	-	100
1,2,3,4,7,8-HxCDF	-	-	-
1,2,3,6,7,8-HxCDF	-	-	3.6
1,2,3,7,8,9-HxCDF	-	-	-
2,3,4,6,7,8-HxCDF	-	-	21.9

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)。

【0041】参考例11 ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成

カルボキシル化フェライト粒子 (日本ペイント社製) を0.1Mリン酸緩衝液 pH5.0にて3回洗浄し、同緩衝液1mlにて懸濁後、5~20 μ g/mlに調整した参考例4で作成したTCP-BSA溶液1mlを添加し25℃ 2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05Mメス緩衝液 pH5.5 1mlに懸濁し、80mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (ナカライテスク社製) 水溶液を50 μ l添加して、ローテーターで25℃ 30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を2ml添加しローテーターで37℃一晩回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を1.5%に合わせてTCP-BSA感作粒子を得た。

【0042】また、前記TCP-BSAに代えてウシ血清アルブミン結合PCB#126 (PCB#126-BSA; KRI社製) を用いて PCB#126-BSA感作粒子を得た。

【0043】参考例12

アルカリフォスファターゼ標識抗PCB#126抗体の作成

抗PCB#126モノクローナル抗体 (PCB77A抗体; KRI社製) を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ (ALP; オリエンタル社製) を結合しALP標識抗PCB#126抗体を得た。

【0044】実施例2

PCB#126の測定

PCB#126の測定は、全自動化学発光免疫測定システム (ルミバルス f; 富士レビオ社製) を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例12で作成したTCP-BSA感作粒子またはPCB#126-BSA感作粒子液各150 μ lに標準抗原90 μ lと酵素標識抗体液50 μ lを加え、37℃ 20分間免疫反応を行い、洗浄後基質液200 μ lを加えて37℃ 5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。前記標準抗原液は、PCB#126 (ジーエルサイエンス社製) を10%ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液に溶解して作成した。PCB#126は0~10ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答 (B/B0 (%)) で標準曲線を求めた。その結果を図2に示す。感作粒子について、TCP-BSA感作粒子とPCB#126-BSA感作粒子とを比較したところ、TCP-BSA感作粒子を用いた方の感度が

高かった。その結果を表1に示す。

【0045】また、TCP-BSA感作粒子を用いたPCB#126測定系に対するPCB#77とPCB#169の交叉反応性と比較的毒性の高い（毒性等価係数；TEF0.1以上）ダイオキシン11種との交叉反応性の測定結果を表2と表3に示す。その結果から、PCB#126測定系ではPCB#77と7.1%の交叉反応性を示し、1, 2, 3, 4, 7, 8-HeCDDと19.7%の交叉反応性を示した。

【0046】参考例13

ウシ血清アルブミン結合ハプテン抗原感作粒子の作成
参考例12のTCP-BSAに代えてPCB#169（3, 3', 4, 4', 5, 5'-ヘキサクロロビフェニル）-BSA（KRI社製）を用いてPCB#169-BSA感作粒子を得た。

【0047】参考例14

アルカリフォスファターゼ標識体抗PCB#169抗体の作成
抗PCB#169モノクローナル抗体（PCB169E抗体；KRI社製）を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ（ALP；オリエンタル社製）を結合しALP標識抗PCB#169抗体を得た。

【0048】実施例3

PCB#169の測定
PCB#169の測定は、全自動化学発光免疫測定システム（ルミパルスf；富士レビオ社製）を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例11で作成したすなわちTCP-BSA感作粒子または参考例13で作成したPCB#169-BSA感作粒子液各150 μ lに標準抗原90 μ lと酵素標識抗体液50 μ lを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質液200 μ lを加えて37℃5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定し

た。

【0049】前記標準抗原液は、PCB#169（ジールサイエンス社製）を10%ジメチルスルホキシド（DMSO）溶液に溶解して作成した。PCB#169は0~10ng/mlの濃度に調整し、標準抗原0濃度のカウント値を100%とした時の各標準抗原液の応答（B/B0（%））で標準曲線を求めた。その結果を図3に示す。感作粒子について、TCP-BSA感作粒子とPCB#169-BSA感作粒子とを比較したところ、TCP-BSA感作粒子を用いた方の感度が高かった。その結果を表1に示す。

【0050】また、TCP-BSA感作粒子を用いたPCB#169測定系に対するPCB#77とPCB#126の交叉反応性と比較的毒性の高い（毒性等価係数；TEF0.1以上）ダイオキシン11種との交叉反応性の測定を表2および表3に示す。その結果からPCB#169測定系ではPCB及びダイオキシンと多数交叉反応性を示すことが認められた。

【0051】

【発明の効果】本発明は、前記一般式（I）で表されるサクシニミドエステルを用いる有機塩素化合物の測定方法であり、PCBやダイオキシンなどの有機塩素化合物を酵素免疫測定法で測定することができる。本発明は、広汎な有機塩素化合物の測定を簡便に行うことができる。

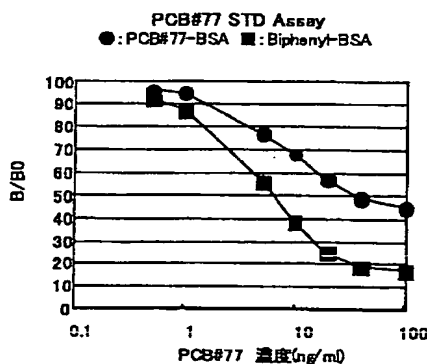
【図面の簡単な説明】

【図1】PCB#77を測定したときの標準曲線を示す。

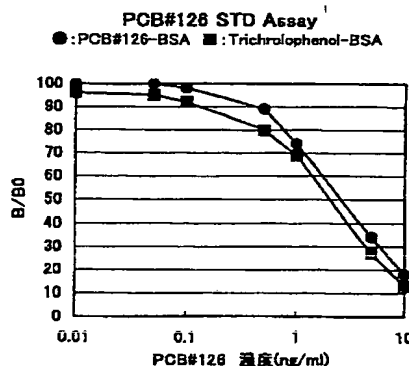
【図2】PCB#126を測定したときの標準曲線を示す。

【図3】PCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

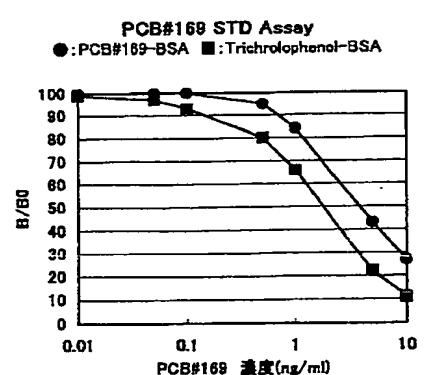
【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成13年2月20日(2001.2.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】本発明に使用することができる酵素標識抗体の酵素は、測定系により影響のない酵素を使用でき、その点、アルカリフォスファターゼは簡便に使用できる。抗体は、本発明を実施することができる抗体ならば

いずれの抗体でもよいが、特開2000-191699に記載のモノクローナル抗体は、感度を向上させる上からも好ましい抗体といえる。なお、本発明は、測定系の組み易さから前記一般式(I)で表されるサクシンイミドエステルをKLH、BSA等に結合させ固相化する方法を挙げたが、本発明がこの方法に限られるものではない。測定に際しては通常の酵素免疫測定の実験環境を整えばよく、特に緩衝溶液等に制限はない。本発明により測定できる有機塩素化合物は、PCB、ダイオキシン等である。